

Н.В. Корожан, В.В. Янченко, Г.Н. Бузук

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ НА СТАБИЛИЗАЦИЮ ТУЧНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

*Изучено влияние полисахаридов и флавоноидов череды трехраздельной на стабилизацию тучных клеток *in vitro*. Полисахариды и флавоноиды череды трехраздельной статистически значимо ($p < 0,05$) уменьшали количество дегранулированных тучных клеток по сравнению с таковым в пробе с аллергеном, что свидетельствовало о стабилизирующем действии полисахаридов и флавоноидов череды трехраздельной в исследуемых дозах на тучные клетки.*

Ключевые слова: череда трехраздельная, флавоноиды, полисахариды, стабилизация тучных клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Трава череды трехраздельной издавна применяется для лечения аллергических реакций. Настой травы череды, а также такие лекарственные средства, как Мазь череды 20% с витамином Е на пчелином воске и Карталин рекомендуются в комплексной терапии атопического дерматита и пиодермии [1, 2].

Однако, несмотря на столь широкое применение травы череды в качестве противоаллергического средства, на сегодняшний день нет однозначных данных о том, какая группа (или группы) биологически активных веществ вносит наибольший вклад в проявление данного вида фармакологической активности.

Согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь [3], лекарственное растительное сырье череды трехраздельной – череда трава – стандартизируется по содержанию в нем полисахаридов. Содержание этой группы биологически активных веществ в траве череды должно быть не менее 3,5%. В то же время имеются публикации, посвященные изучению противоаллергической активности спиртовых извлечений, содержащих фенольные соединения, а также отдельных флавоноидов, выделенных из других видов череды [4, 5]. В связи с этим изучение противоаллергической активности флавоноидов и полисахаридов череды трехраздельной с целью обоснования выбора основной группы биологически активных веществ для стандартизации травы череды является актуальным.

В настоящее время имеется ряд методик для изучения противоаллергической активности лекарственных средств и ле-

карственного растительного сырья [6–8]. При этом одной из наиболее показательных из них является не прямой тест дегрануляции тучных клеток (метод Шварца). Данный тест используется не только для изучения противоаллергической активности исследуемых объектов, но и для диагностики аллергии в целом [8].

Тучные клетки занимают одно из центральных мест в аллергической реакции. Тучные клетки представляют собой клетки соединительной ткани позвоночных животных с метахроматической зернистостью протоплазмы, способные вырабатывать, сохранять и выделять такие биологически активные вещества, как гепарин, гистамин, серотонин, интерлейкины, нейтральные протеазы. При активации во время аллергической реакции тучные клетки рецепторным путем через Fc-рецепторы к Fc_ε-фрагментам IgE-антител изменяют свою поверхность и высвобождают содержимое гранул в окружающую ткань, то есть происходит дегрануляция. Биологическая активность названных выше соединений проявляется их влиянием на другие клетки и ткани органов-мишеней, что вызывает внешние признаки гиперчувствительности (аллергии).

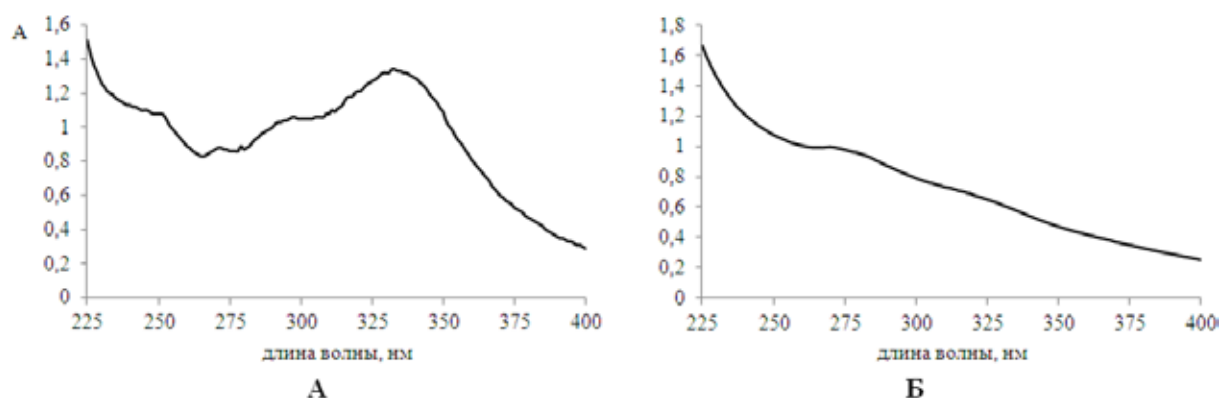
Поэтому количество дегранулированных тучных клеток является показателем состояния сенсibilизации организма, на фоне которой проявляется противоаллергическая активность лекарственных средств и лекарственного растительного сырья [8, 9].

Целью данной работы является изучение влияния флавоноидов и полисахаридов череды трехраздельной на стабилизацию тучных клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые фракции флавоноидов и полисахаридов череды трехраздельной получали следующим образом. К настою травы череды трехраздельной, полученному согласно требованиям [3], добавляли трехкратный объем 95% этилового спирта (об/об) и подогревали на водяной бане (50°C) в течение 5 минут. Осадок полисахаридов отфильтровывали через бумажный фильтр. Фильтрат, содержащий преимущественно фракцию флавоноидов,

упаривали до сухого остатка. Осадок полисахаридов растворяли в небольшом количестве воды очищенной и полученный раствор дополнительно очищали. Очищенный от флавоноидов раствор упаривали до сухого остатка. Чистоту полученной фракции полисахаридов оценивали спектрофотометрически, снимая спектр поглощения полученного раствора в диапазоне длин волн от 225 до 400 нм. Спектры поглощения исходного настоя, фильтрата и очищенной фракции полисахаридов представлены на рисунке 1.



А – спектр поглощения исходного настоя;

Б – спектр поглощения очищенного раствора полисахаридов

Рисунок 1 – Спектры поглощения настоя и очищенного раствора полисахаридов в диапазоне длин волн 225–400 нм

Отсутствие в спектре раствора полисахаридов максимумов поглощения при 250 и 330 нм свидетельствовало об отсутствии в нем веществ флавоноидной природы.

Изучение специфической активности проводили на беспородных мышах-самцах массой 18–22 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН (Ленинградская область, Всеволожский район). Животные содержались в виварии ВГМУ в соответствии с установленными требованиями [10, 11]. В работе соблюдены требования гуманного обращения с экспериментальными животными [11]. Постановка экспериментального исследования с использованием лабораторных животных соответствовала рекомендациям Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report, Надлежащей лабораторной практике [12–14].

Опытных животных делили на две группы: интактная и исследуемая. Интактная группа в течение 14 дней не подвергалась

никаким манипуляциям. Исследуемую группу сенсibilизировали аллергеном эпидермальным из шерсти кошки («Биомед имени И.И. Мечникова», Россия) по рекомендуемой [15] схеме. Аллерген в дозе 500 PNU/мл вводили внутривенно в объеме 0,1 мл 2 раза с интервалом в один день. Через день после последней инъекции животным вводили аллерген в дозе 1000 PNU/мл в объеме 0,1 мл. Выполняли две инъекции с интервалом в один день.

Со дня последней инъекции отсчитывали семь дней и осуществляли дислокацию шейных позвонков животных интактной и исследуемой групп. Затем в брюшную полость вводили 5 мл подогретого до температуры 37°C фосфатного забуференного физиологического раствора с pH=7,4 и в течение 1–2 минут массировали брюшную стенку мыши, после чего иглой со шприцем собирали промывную жидкость из брюшной полости, переносили в пробирку с гепарином (20 ед/мл), центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали,

осадок клеток растворяли в фосфатном физиологическом растворе с pH=7,4. Из полученной от каждого животного суспензии тучных клеток формировали контрольные и исследуемые пробы. К контрольным пробам добавляли фосфатный физиологический раствор с pH=7,4 или аллерген в дозе 100 PNU/мл в объеме 0,1 мл. К исследуемым пробам добавляли растворы фракции полисахаридов (5 мг/мл) или фракции флавоноидов (10 мг/мл) и аллерген в дозе 100 PNU/мл в объеме 0,1 мл.

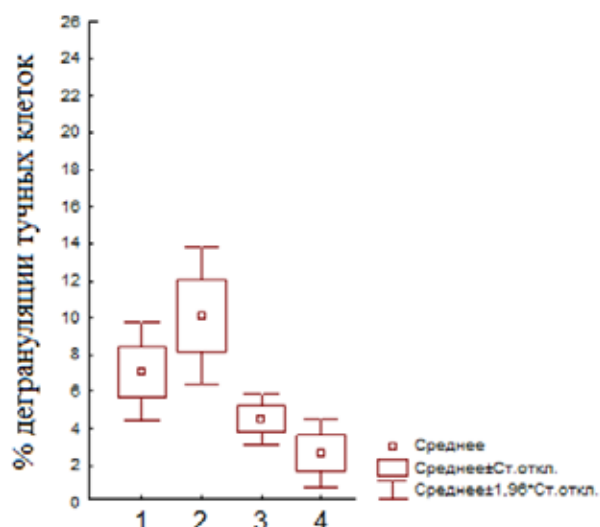
Пробирки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 15 мин. Затем добавляли 0,1% раствор толуидинового синего и дополнительно инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 20 мин. В 20 мкл полученного раствора производили подсчет 100 тучных клеток, среди которых определяли количество дегранулированных тучных клеток. Тест считался от-

рицательным, если процент клеток с такой реакцией не превышал 15%.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 6.1». Рассчитывали такие статистические параметры, как среднее значение, стандартное отклонение и полуширина доверительного интервала. Для сравнения процента дегрануляции тучных клеток в исследуемых группах использовали непараметрический критерий U Манна-Уитни.

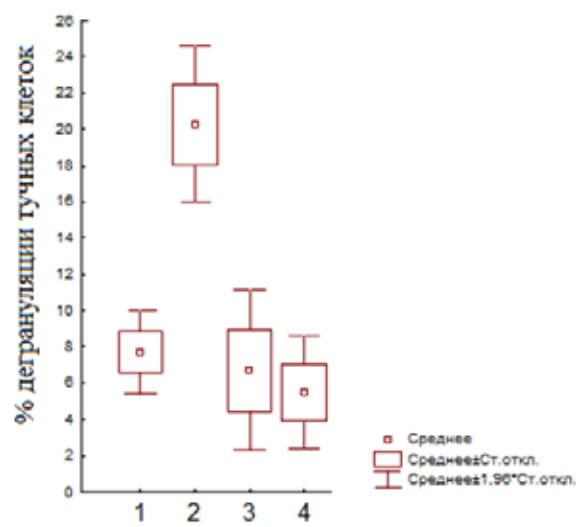
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 2 и 3 представлены результаты определения процента дегрануляции тучных клеток в интактной и исследуемой (сенсibilизированной) группах до и после добавления к клеткам флавоноидов и полисахаридов череды трехраздельной.



1 – физиологический раствор;
2 – физиологический раствор + аллерген;
3 – полисахариды; 4 – флавоноиды
Рисунок 2 – Процент дегрануляции тучных клеток в интактной группе

Как видно из рисунка 2, в интактной группе при воздействии аллергена на тучные клетки отмечается увеличение количества дегранулированных тучных клеток в 1,5 – 2,2 раза по сравнению с контролем и составляет 8 – 14%. Однако такое значение процента дегрануляции тучных клеток не свидетельствует о наличии сенсibilизации у животных интактной группы к данному аллергену. Количество дегранулированных тучных клеток при добавлении полисахаридов или флавоноидов к



1 – физиологический раствор;
2 – физиологический раствор + аллерген;
3 – полисахариды; 4 – флавоноиды
Рисунок 3 – Процент дегрануляции тучных клеток в сенсibilизированной группе

клеткам животных интактной группы статистически значимо ($p < 0,05$) уменьшалось по сравнению с контролем в 1,5 – 2,5 раза для полисахаридов и в 2 – 4 раза – для флавоноидов, что свидетельствует о стабилизирующем действии на тучные клетки данных фракций череды трехраздельной.

Как видно из рисунка 3, количество дегранулированных тучных клеток в контроле сенсibilизированной группы в 1,2 раза больше по сравнению с контролем интактной группы. Процент тучных кле-

ток, дегранулировавших при добавлении аллергена, составил $20,3 \pm 1,3\%$, что более чем в 2,5 раза выше, чем в контроле сенсibilизированной группы. Указанное увеличение количества дегранулированных тучных клеток свидетельствует о выраженном проявлении аллергической реакции ($p < 0,05$).

При добавлении к клеткам сенсibilизированной группы в присутствии аллергена полисахаридов или флавоноидов череды трехраздельной отмечалось значительное уменьшение количества дегранулированных тучных клеток. В присутствии полисахаридов оно уменьшалось в 2 – 3,5 раза и составляло $6,7 \pm 1,3\%$, для флавоноидов – в 3 – 5,5 раза и составляло $5,5 \pm 0,9\%$, соответственно, и количество дегранулированных тучных клеток в исследуемых группах было близко или несколько ниже, чем в контроле интактной группы.

Количество дегранулированных тучных клеток в исследуемых пробах статистически значимо отличалось от количества этих клеток в пробе с аллергеном ($p < 0,05$), что свидетельствовало о стабилизирующем действии на тучные клетки полисахаридов и флавоноидов череды трехраздельной в исследуемых дозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние флавоноидов и полисахаридов череды трехраздельной на стабилизацию тучных клеток *in vitro*. Установлено, что полисахариды и флавоноиды череды трехраздельной статистически значимо ($p < 0,05$) уменьшали количество дегранулированных тучных клеток в 2 – 3,5 и 3 – 5,5 раза соответственно, что свидетельствовало об их стабилизирующем действии на тучные клетки.

SUMMARY

N.V. Karazhan, V.V. Yanchanka, G.N. Buzuk
INFLUENCE OF FLAVONOIDS AND
POLYSACCHARIDES
OF BUR-MARIGOLD ON STABILIZING
MAST CELLS *IN VITRO*

The effect of polysaccharides and flavonoids of bur-marigold on stabilization of mast cells *in vitro* was studied. Polysaccharides and flavonoids of bur-marigold statistically considerably ($p < 0,05$) reduced the number of degranulated mast cells as compared to that

in the sample with an allergen, indicating a stabilizing effect on mast cells of polysaccharides and flavonoids in the studied doses.

Keywords: bur-marigold, flavonoids, polysaccharides, stabilization of mast cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в Новых независимых государствах (ННГ). – 2006. – 464 с.

2. Об установлении перечня лекарственных средств, реализуемых без рецепта врача: постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 5 июня 2012 г., №55 // Эталон – Беларусь [Электронный ресурс] / Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь. – Минск, 2012.

3. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / Центр экспертизы и испытаний в здравоохранении // Под общ. ред. А.А. Шерякова – Молодечно: Победа. – 2008. – 472 с.

4. Structures and antihistamine activity of chalcones & aurones compounds from *Bidens parviflora* Willd / J. Wang [et al.] // Journal of Traditional Medicines. – 2007. – №2. – P. 23 – 29.

5. Horiuchi, M. Antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff / M. Horiuchi, Y. Seyama // Journal of Health Science. – 2006. – Vol. 52. – №6. – P. 711 – 717.

6. Куцык, Р.В. Лекарственные растения и перспективы антиаллергической терапии / Р.В. Куцык, Б.М. Зузук, Л.М. Куровец // Провизор. – 1998. – №8. – С. 36 – 42.

7. Chitme, H.R. Antiallergic activity of *Aristolochia bracteolata* Lank in animal model / H.R. Chitme [et al.] // Indian journal of experimental biology. – 2010. – Vol. 48. – P. 46 – 52.

8. Новиков, Д.К. Аллергические реакции на лекарства и медикаменты. Пособие. / Д.К. Новиков, В.И. Новикова, П.Д. Новиков. – Витебск: ВГМУ, 2012. – 48 с.

9. Киричек, Л.Т. Степень дегрануляции тучных клеток как показатель противоаллергического действия лекарственных средств / Л.Т. Киричек [и др.] // Материалы Всеукраинской научно-практической конференции «Медицинская наука-2010».

– 2010. – С. 107 – 110.

10. СанПиН 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)»: постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006 г., №131.

11. Юденко, О.А. Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Витебского государственного медицинского университета и мерах по реализации требований биомедицинской этики / О.А. Юденко, Т.В. Буйнова. – Витебск: ВГМУ, 2010. – 36 с.

12. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasbourg, Council of Europe. – 18.03.1986. – 51 p.

13. Council Directive on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animal Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – 24.11.1986.

14. Надлежащая лабораторная прак-

тика: Технический кодекс установившейся практики (ТКП) 125-2008 (02040): постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 28 мар. 2008 г., №56// Эталон – Беларусь [Электронный ресурс] / Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь. – Минск, 2008.

15. Выхристенко, Л.Р. Аллергоспецифическая иммунотерапия атопической бронхиальной астмы и аллергического ринита пероральными низкодозовыми аллерговакцинами : дис. ... док. мед. наук: 14.03.09 / Л.Р. Выхристенко. – Витебск, 2014 – 265 с.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
Витебский государственный
медицинский университет,
кафедра фармакогнозии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8 (0212) 37-09-29,
k_natashka@mail.ru
Корожан Н.В.

Поступила 30.06.2014 г.